

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**Zagreb, Rujan 2017**

**Jure Prtenjača**  
**756/PI**

**UTJECAJ MIKOTOKSINA NA  
PARAMETRE RASTA BAKTERIJA  
MLIJEČNE KISELINE,  
POTENCIJALNIH STARTER  
KULTURA ZA PROIZVODNJU  
FERMENTIRANIH NAMIRNICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Ksenije Markov, red.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć mag.ing. Željka Jakopovića

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorici, prof.dr.sc. Kseniji Markov na strpljenju, savjetima i potpori tijekom pripreme, provedbe i pisanja diplomskog rada. Veliko hvala i mag.ing. Željku Jakopoviću na maksimalnoj motivaciji i entuzijazmu te svom prenijetom znanju.

Najveća zahvala ide mojoj Juliji koja je kroz cijelo moje školovanje bila puna ljubavi, bezuvjetne podrške i neizmjerne vjere u moje uspjehe te prijateljima bez kojih studentski dani ne bi bili najljepši i najveseliji.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ MIKOTOKSINA NA PARAMETRE RASTA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE, POTENCIJALNIH STARTER KULTURA ZA PROIZVODNJU FERMENTIRANIH NAMIRNICA

*Jure Prtenjača, 756/PI*

**Sažetak:** Prema procjeni FAO-a, 25% hrane proizvedeno u svijetu kontaminirano je mikotoksinima. Zbog toksičnog učinka, ne samo na ljude, životinje i biljke već i mikroorganizme, postoji zabrinutost zbog ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka, tzv. „carry over“ efektom. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj aflatoksina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) i zearalenona (ZEA) na rast i morfološke osobine odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus*, potencijalnih starter kultura za proizvodnju fermentiranih namirnica. Mikrobni rast ovisi o uvjetima okoline u kojoj se mikroorganizmi nalaze kao i izloženosti kemijskim agensima, a toksično djelovanje mikotoksina najčešće se očituje kroz inhibiciju rasta. Rast bakterija mliječne kiseline (BMK) ispitivan je u prisutnosti AFB<sub>1</sub> i ZEA različitih koncentracija tijekom 24 satnog uzgoja u MRS podlozi, a izražen je brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi u obliku log<sub>10</sub> CFU/mL. Metoda mikrometrije korištena je za određivanje veličine stanica, kao morfološke osobine. Iz dobivenih rezultata uočeno je da istraživani mikotoksini u različitim koncentracijama imaju utjecaj na veličinu, broj živih stanica, ali ne i na konačan broj ispitivanih stanica BMK.

**Ključne riječi:** aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenon, bakterije mliječne kiseline, broj bakterija, morfološke osobine bakterija

**Rad sadrži:** 40 stranica, 12 slika, 52 literaturna navoda

**Jezik izvorni:** hrvatski

**Rad je tiskan u električnom obliku (PDF format) pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof.dr.sc. Ksenija Markov

**Pomoć pri izradi:** Željko Jakopović, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Jadranka Frece
2. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
3. Izv.prof.dr.sc. Jasna Mrvčić
4. Prof.dr.sc. Blaženka Kos (zamjena)

**Datum obrane:** 28. rujna, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### EFFECT OF MYCOTOXINS ON PARAMETERS OF LACTIC ACID BACTERIA, POTENTIAL STARTER CULTURES FOR THE PRODUCTION OF FERMENTED FOODSTUFFS

*Jure Prtenjača, 756/PI*

**Abstract:** According to FAO estimates, 25% of food produced in the world is contaminated with mycotoxins. Because of the toxic effect not only on humans, animals and plants, but also on microorganisms, there is concern about the introduction of mycotoxins into the human food chain, by so-called „carry over“ effect. The aim of this paper was to investigate the effects of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and zearalenone (ZEA) on growth and morphological properties of selected strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Leuconostoc mesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus*, potential starter cultures for fermented foods. Microbial growth depends on the conditions of the environment in which microorganisms are found as well as exposure to chemical agents, and the toxicity of mycotoxins is most often manifested through growth inhibition. The growth of lactic acid bacteria (LAB) was investigated in the presence of AFB<sub>1</sub> and ZEA at various concentrations during 24 hours of cultivation in the MRS broth and expressed by counting the growing colonies on a solid nutrient medium in the form of log<sub>10</sub> CFU/mL. The micrometric method was used to determine the cell size as a morphological trait. From the obtained results it is observed that mycotoxins at different concentrations have an effect on size, number of live cells but not on the final number of LAB cells.

**Keywords:** aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenon, lactic acid bacteria, bacterial count, morphological characteristics of bacteria

**Thesis contains:** 40 pages, 12 figures, 52 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis printed in and electronic (PDF format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD Ksenija Markov, Full professor

**Technical support and assistance:** Željko Jakopović, Research associate.

**Reviewers:**

1. PhD. Jadranka Frece, Full professor
2. PhD. Ksenija markov, Full professor
3. PhD. Jasna Mrvčić, Associate professor
4. PhD. Blaženka Kos, Full professor (substitute)

**Thesis delivered:** September 28<sup>th</sup>, 2017.

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. MIKOTOKSINI .....	2
2.1.1. Aflatoksin B <sub>1</sub> .....	3
2.1.2. Zearalenon .....	4
2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....	6
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	7
2.2.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	7
2.2.3. <i>Pediococcus pentosaceus</i> .....	8
2.3. MIKROBNI RAST .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>10</b>
3.1. MATERIJALI .....	10
3.1.1. Mikroorganizmi .....	10
3.1.2. Hranjive podloge bakterija mliječne kiseline .....	10
3.1.3. Mikotoksini .....	11
3.1.4. Aparatura .....	11
3.1.5. Pribor .....	11
3.2. METODE RADA .....	12
3.2.1. Priprema otopine standarda mikotoksina AFB <sub>1</sub> i ZEA .....	12
3.2.2. Priprema uzoraka .....	12
3.2.3. Određivanje broja živih stanica BMK .....	12
3.2.4. Mikrometrija .....	14
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>16</b>
4.1. Utjecaj mikotoksina na rast BMK .....	16
4.2. Utjecaj mikotoksina na morfološke osobine BMK .....	24
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>34</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>35</b>

# 1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji negativno utječu ne samo na ljude, životinje i biljke već i na mikroorganizme. Mikotoksine možemo smatrati 'prirodnim' kontaminantima, a načela koja se primjenjuju za procjenu opasnosti rizika od mikotoksina slična su onima za ostale kemijske opasnosti. Nema dokaza da su se živi organizmi prilagodili na prisutnost tih prirodnih kemijskih tvari u hrani više nego na prisutnost umjetnih tvari, kao što su pesticidi ili drugi kontaminanti hrane (Kuiper-Goodman, 1995).

Iako se prema procjeni FAO-a smatra da je 25% hrane, uglavnom biljnog podrijetla, koja se proizvodi u svijetu kontaminirano mikotoksinima (HAH, 2012), postoji zabrinutost zbog faktora prijenosa ili tzv. „carry over” efekta jer mikotoksini u prehrambeni lanac čovjeka, mogu ući i kroz meso, jaja, mlijeko i mliječne proizvode (Markov i sur. 2013; Giovati i sur., 2015; Pleadin i sur., 2015). S obzirom na toksičnost mikotoksina od iznimne je važnosti kontrolirati njihovu prisutnost i količinu u hrani. U istraživanjima mnogih autora (Haskard i sur. 2001; Peltonen i sur. 2001; Markov i sur. 2010; Khoury i sur., 2011; Elsanhoty i sur., 2014) dokazano je vezanje/uklanjanje mikotoksina s pomoću bakterija mliječne kiseline (BMK), za koje postoje mnogobrojni dokazi o korisnom djelovanju i značajnom potencijalu za primjenu u funkcionalnoj hrani (Šušćković i sur., 1997; Magnusson, 2005; Giovati i sur., 2015; Frece i Markov 2016). Bakterije mliječne kiseline su od velike važnosti za čovjeka jer se već tisućama godina tradicionalno koriste u proizvodnji fermentiranih namirnica. Za proizvodnju fermentirane hrane broj i aktivnost stanica BMK od velike je važnosti, a rast stanica ovisi o okolišnim čimbenicima te izloženosti kemijskim tvarima kao što su mikotoksini. Budući da se o utjecaju mikotoksina na rast stanica bakterija, njihove morfološke i metaboličke karakteristike zna vrlo malo, cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj mikotoksina AFB<sub>1</sub> i ZEA na broj živih stanica i morfološke osobine bakterija *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus*, potencijalnih starter kultura za proizvodnju fermentirane hrane.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini predstavljaju skupinu stabilnih kemijskih spojeva različite strukture i različitog biološkog djelovanja (Markov i sur., 2010; HAH, 2013). To su molekule niske molekularne mase koje variraju od jednostavnih pa do strukturno složenih spojeva (Steyn, 1995). Ne sudjeluju u primarnom metabolizmu plijesni već su sekundarni produkti i nemaju određenu metaboličku funkciju pri njihovom rastu i razvoju (Duraković i Duraković, 2000). Tvorba sekundarnih metabolita ovisna je o vrsti i soju plijesni i nastaje kao odgovor na uvjete okoline, odnosno fizikalno kemijske parametre (količina slobodne vode -  $a_w$ , temperatura, količina kisika, sastav i pH supstrata). Značenje mikotoksina u životu mikroorganizama koji ih stvaraju nije još potpuno razjašnjeno (Duraković i Duraković, 2000).

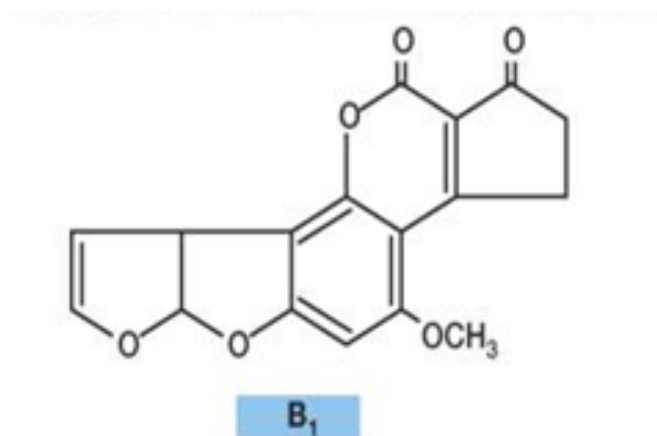
Mikotoksine prirodno sintetiziraju različiti rodovi pljesni (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus*) koje mogu rasti na različitim usjevima i namirnicama uključujući žitarice, orašaste plodove, začine, suho voće, jabučni sok, kavu, a posebno im odgovaraju topli i vlažni uvjeti (Oancea i Stoia, 2008). Neke plijesni imaju sposobnost sinteze više od jednog mikotoksina, dok su neki mikotoksini proizvodi više različitih vrsta plijesni (Duraković, 1991). Zbog šarolikosti u kemijskoj strukturi, širok je raspon toksičnih učinaka koje mikotoksini izazivaju. Posebno su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i u većini slučajeva zbog odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja sadrži mikotoksine (Duraković i Duraković, 2000; Markov i sur. 2010; Markov i sur. 2013).

Do danas je otkriveno oko četristo vrsta mikotoksina, od čega su najučestaliji kontaminanti hrane aflatoksini (aflatoksin B<sub>1</sub>, aflatoksin M<sub>1</sub>), okratoksini (okratoksin A, okratoksin B), zearalenon (ZEA), fumonizini (fumonizin B<sub>1</sub>, fumonizin B<sub>2</sub>), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (HAH, 2013; Hassan i sur., 2015; Varsha i Napoothiri, 2016).

### 2.1.1. Aflatoksin B<sub>1</sub>

Aflatoksini su toksični, karcinogeni, imunosupresivni metaboliti, smjese kemijski srodnih spojeva, derivata difurokumarina, koje sintetizira ograničen broj sojeva plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Dalić i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016). Najčešći producenti aflatoksina su plijesni *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus niger* koje kontaminiraju biljni supstrat (usjeve) tijekom skladištenja, uz povoljne temperature (iznad 32°C i vlažnost veću od 15%) (Kosalec i Pepeljnjak, 2004). U životinja i ljudi aflatoksini se opisuju kao odgovorni uzročnici mnogih bolesti, često sa smrtonosnim ishodom, koje su prouzročene uživanjem pljesnivih namirnica. Biosintetski put tih sekundarnih metabolita naziva se poliketidni put. Kemijski, aflatoksini su policiklični spojevi koji sadrže kumarinsku jezgru spojenu na bifuran i na pentanon. Ovi spojevi snažno fluoresciraju pod UV svjetlom. Izvorno su kromatografski odvojeni u skupine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> (Oancea i Stoia, 2008). Oznake B i G označavaju boju (B – eng. blue, plavo; G – eng. green, zeleno) kojom aflatoksini fluoresciraju pri određenoj valnoj duljini UV-svjetlosti, a M označava supstrat iz kojeg su izolirani (M – eng. milk, mlijeko) (Duraković i Duraković, 2000).

Najčešće prisutan i najtoksičniji od svih aflatoksina je aflatoksin B<sub>1</sub> (slika 1) (Sezer i sur., 2013; Giovati i sur., 2015). Smatra se da je AFB<sub>1</sub> jedan od najpoznatijih karcinogenih agenasa koji izazivaju karcinom jetre u životinja pa i ljudi. Toksičnost AFB<sub>1</sub> za humane stanice “*in vitro*” iznosi LD<sub>50</sub> 1 µg kg<sup>-1</sup>. Srednja letalna doza (LD<sub>50</sub>) AFB<sub>1</sub> za 50% tretiranih životinja varira od 0,5 do 10,0 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase životinje. Kod svih životinja osjetljivost se smanjuje starenjem, tako da su mlade životinje mnogo osjetljivije na akutno otrovanje toksinom od starijih životinja (Markov, 1991).



**Slika 1.** Kemijska struktura aflatoksina B<sub>1</sub> (Oancea i Stoia, 2013)

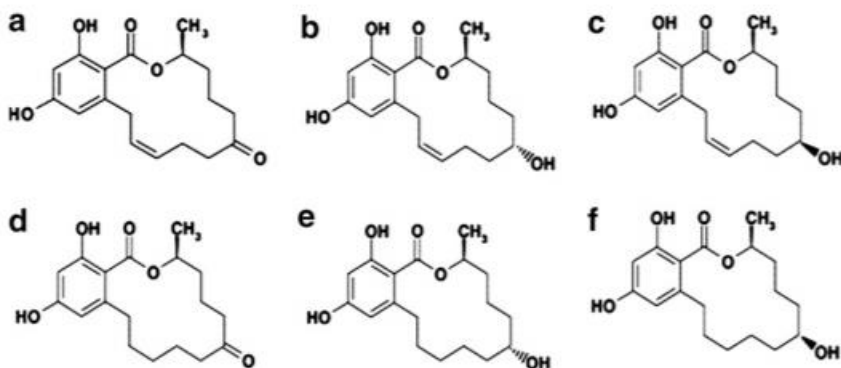
Način djelovanja AFB<sub>1</sub> je kroz inhibicijski učinak na replikaciju DNA i RNA te na sintezu proteina. Nasuprot mnogim mikotoksinima, aflatoksini moraju biti biološki transformirani prije nego što izazovu reakciju u živom organizmu. Kao rezultat biotransformacije, specifični enzimi P450 u jetri metaboliziraju aflatoksine u reaktivne kisikove spojeve (aflatoksin-8,9-epoksid), koji se mogu onda vezati za proteine i uzrokovati akutnu toksičnost (aflatoksikozu) ili vezati za DNK i izazvati rak jetre (Yitbarek i Tamir, 2013).

### 2.1.2. Zearalenon

Mikotoksin zearalenon (ZEA) spada u skupinu makrocikličnih laktona. Izoliran je 1962. godine iz kulture plijesni *Giberella zeae*, koja je spolni stadij plijesni *Fusarium graminearum*. Zearalenon se pojavljuje kao metabolit plijesni *Fusarium roseum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium tricinctum* i *Fusarium moniliforme*. Danas je poznato preko 150 derivata zearalenona, među kojima je najznačajniji  $\alpha$ -zearalenol, ujedno tri do četiri puta toksičniji od zearalenona, te  $\beta$ -izomer čija je aktivnost približno jednaka zearalenonu (Pleadin i sur., 2015).

Zearalenon i njegovi metaboliti poznati su po estrogenim i anaboličkim osobinama, a i osobinama poticanja rasta. On je, stoga, uključen kao anabolički agens za poboljšanje rasta i djelotvornije iskorištenje krme kod ovaca i goveda. Na osnovu istraživanja Wolf i Mirocha (1977) čini se da zearalenon djeluje kao fungalni spolni hormon (Duraković, 2003).

Zearalenon je nesteroidni estrogenski mikotoksin biosintetiziran kroz poliketidni slijed raznih fuzarijskih plijesni. ZEA je resorciklični lakton, kemijski opisan kao 6-[10-hidroksi-6-okso-trans-1-undecenil]- $\beta$ -lakton rezorcilne kiseline i pripada skupini prirodnih spojeva rezorcilata. (slika 4). Trivijalno ime zearalenon je dobio kao kombinacija *G. zae*, resorcikličnog kiselinskog laktona i nastavka -en (zbog prisutnosti dvostruke veze između C-1 i C-2) (Zinedine, 2007).



**Slika 2.** Kemijske strukture ZEA i njegovih derivata: (a) zearalenon (ZEA), (b)  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEA), (c)  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEA), (d) zearalanon (ZAN), (e)  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL), (f)  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) (Zinedine, 2007).

Reducirani oblik zearalenona, zearalenol, ima povišenu estrogensku aktivnost. Sintetski komercijalno dostupna formulacija pod nazivom Ralgro se uspješno marketinški plasirala kao anabolički agens za ovce i stoku. Zearalenol je 1989. zabranjen od strane Europske Unije, ali se i dalje koristi u ostalim dijelovima svijeta. Riječ otrov je skoro pa netočan naziv za ZEA jer ZEA, iako biološki snažan, pokazuje nisku toksičnost. Zbog sličnosti sa 17  $\beta$ -estradiolom (glavnim hormonom kojeg proizvode ljudski jajnici, a koji mu omogućuje vezanje na receptore estrogena u ciljanim stanicama kod sisavaca) ZEA je bolje klasificirati kao nesteroidni estrogen ili mikoestrogen. Ponekad se naziva i fitoestrogen (Bennet i Klich, 2003).

Poznato je da je ZEA relativno niske akutne toksičnosti ( $LD_{50}=2000-20\,000\text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne težine) nakon oralne primjene u miševa, štakora i zamorca, a toksičnost mu se povećava kada se daje intraperitonealno. ZEA se pokazao genotoksičnim jer izazva formiranje DNA adukta

u *in vitro* kulturama limfocita goveda, u *Vero* bubrežnim stanicama majmuna i u stanicama koštane srži u miševa (Zinedine, 2006).

O toksičnom djelovanju zearalenona u ljudi ima relativno malo rezultata, ali se pretpostavlja da zearalenon u nekim zemljama (Mađarska) gdje je čest kontaminant hrane (čak i tzv. "zdrave hrane") uzrokuje početak puberteta u djevojčica prije osme godine života kao i učestale spontane pobačaje. Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (IARC) nije mogla dati ocjenu o karcinogenosti zearalenona u čovjeka, zato što nema dovoljno podataka o njegovom djelovanju na pokusne životinje, kao i nedovoljno epidemioloških podataka te je zearalenon svrstan u skupinu 3 (nije klasificiran kao karcinogen za čovjeka) (IARC, 1993).

## **2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE**

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su najčešće korištene starter kulture u industrijskoj proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, mesa i povrća. Duga tradicija upotrebe bakterija mliječne kiseline bez štetnog utjecaja na zdravlje čovjeka, pribavila im je GRAS (Generally Regarded As Safe) status prema US FDA, odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema legislativi Europske Unije (Šušković, 1996; Šušković i sur., 2001; Kos, 2001; Frece, 2007; Frece i sur., 2010a). Već više od tri desetljeća provode se istraživanja kojima bi se, uz sva već dokazana poželjna svojstva, bakterijama mliječne kiseline pripisala i sposobnost vezanja mikotoksina iz sredine u kojoj se nalaze. BMK imaju sposobnost biosinteze širokog spektra antimikrobnih metabolita, koji između ostalog inhibiraju i rast mikotoksikogenih plijesni (Schnürer i Magnusson, 2005; Muñoz i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016). Biokonzervirajući učinak nastaje zbog smanjenja pH i uglavnom je vezan uz proizvodnju organskih kiselina, odnosno mliječne kiseline ili octene kiseline, natjecanja za hranjive tvari i proizvodnju bakteriocina, ali i drugih spojeva kao što su vodikov peroksid, mravlja kiselina, propionska kiselina, acetoin i diacetil. Međutim, primjena ovih antimikrobnih spojeva može biti ograničena zbog uskog inhibicijskog spektra i njihove nestabilnosti pod određenim uvjetima. Točan mehanizam antimikrobnog djelovanja često se ne može objasniti zbog složene interaktivne prirode između različitih spojeva, međutim sinergijski efekti često su vidljivi između spojeva koji su uključeni u antimikrobno djelovanje (Lowe i Arendt, 2004).

### **2.2.1. *Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* je heterofermentativna mikroaerofilna gram-pozitivna bakterija, štapićastog oblika. Može se pojavljivati pojedinačno ili grupirano u kratkim lancima. Ova vrsta je dobro prihvaćena i ima GRAS status. Brojni sojevi *L. plantarum* izolirani su iz različitih ekoloških niša koje uključuju meso, ribu, voće, povrće, mlijeko i žitarice. Zbog proizvodnje mliječne kiseline i drugih antimikrobnih spojeva, *L. plantarum* također pridonosi sigurnosti finalnog proizvoda (Todorov Dimitrija, 2012). U mnogim proizvodima, ova vrsta laktobacila se koristi kao starter kultura prilikom industrijske proizvodnje hrane jer pridonose očuvanju okusa i teksture fermentiranih namirnica. Osim što se kao starter kulture koriste u proizvodnji fermentirane hrane, dodaju se i kao biokonzervansi, s ciljem produljenja trajnosti proizvoda (Frece i Markov, 2016).

Dokazana je i njihova učinkovitost u liječenju sindroma iritabilnog crijeva (IBS – Irritable Bowel Syndrome) (Ducrotté i sur., 2012). Pozitivno djeluju na zdravlje domaćina zahvaljujući antimikrobnom efektu koji ispoljavaju prema patogenim mikroorganizmima, pomažu u metabolizmu mliječnog šećera (laktoze), potiču imunološki sustav, utječu na snižavanje koncentracije kolesterola u krvi, a imaju i antikancerogeno djelovanje (Šušković i Kos, 2001).

### **2.2.2. *Leuconostoc mesenteroides***

Rod *Leuconostoc* obuhvaća gram-pozitivne, katalaza negativne bakterije nepravilnog kuglastog oblika. Razlika između heterofermentativnih laktobacila koji proizvode plinove i bakterija iz roda *Leuconostoc* je dugo bila kontroverzna. U stvari, ova dva roda se smatraju filogenetski pomiješanima (Villani, 1997).

Bakterije iz roda *Leuconostoc* su široko rasprostranjene u prirodi, no zbog slabe kiselinske aktivnosti, nisu široko istražene. Osim uloge u kvarenju hrane, smatraju se kao pojačivači okusa u procesu fermentacije mliječnih proizvoda, vina i povrća. Njihova prepoznatljiva antagonistička ili sinergistička svojstva u miješanoj mikroflori izazvala je interes za istraživanje njihove važnosti u nekim starter kulturama (Villani, 1997).

Fermentacija povrća u mnogim zemljama još uvijek se radi na tradicionalan način, spontanom fermentacijom te zbog toga nema uniformnosti proizvoda. Nekoliko vrsta fakultativno anaerobnih bakterija mliječne kiseline sudjeluju u fermentaciji povrća. Među njima *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* je najvažnija jer se prirodno nalazi na povrću. Bakterija *L. mesenteroides* nepoželjna je u tvornicama šećera jer se najčešće povezuje s tvorbom sluzi zbog njezine sposobnosti sinteze polisaharida dekstrana (Duraković, 1996).

Djelovanjem bakterija iz roda *Leuconostoc* senzorska kvaliteta proizvoda može biti neprihvatljiva za potrošnju te to može predstavljati veliki ekonomski gubitak u prehrambenoj industriji (Wang i sur., 2013).

### **2.2.3. *Pediococcus pentosaceus***

*Pediococcus pentosaceus* je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, nesporogena bakterija i pripada skupini industrijski važnih BMK. Poput drugih bakterija mliječne kiseline, *P. pentosaceus* je tolerantna na kisele uvjete, ne može sintetizirati porfirine i posjeduje strogo fermentacijski metabolizam s mliječnom kiselinom kao glavnim metaboličkim krajnjim proizvodom (Axelsson, 1998).

*Pediococcus* sojevi su široko distribuirani u piću, fermentiranoj hrani i mliječnim proizvodima (Tanasupawat i sur., 1993). U mlijeku i mliječnim proizvodima poput sira, mogu rasti tijekom sazrijevanja i fermentirati rezidualnu laktozu tijekom dugog razdoblja. Pronađene su u velikom broju ( $10^7$ - $10^8$  CFU g<sup>-1</sup>) u Cheddar siru nakon 3 mjeseca sazrijevanja, a taj broj stanica održao se do 12 mjeseci. U ovom okruženju može doći do raznih interakcija između *pediococca* i ostalih mikroorganizama prisutnih u siru (Litopoulou-Tzanetaki, 1987).

Bakterije iz roda *Pediococcus* su vrlo otporne na visoke razine glikopeptida (vankomicin i teikoplanin). Dijeleg ovo svojstvo s drugim gram-pozitivnim bakterijama, kao što su bakterije iz roda *Leuconostoc* i pojedinim vrstama laktobacila. Ove glikopeptidne otporne bakterije pojavljuju se kao oportunistički patogeni kod ljudi, vjerojatno zbog povećanog korištenja vankomicina i teikoplanina u ljekovitim proizvodima (Tankovic i sur., 1993).

### 2.3. MIKROBNI RAST

Proces udvostručavanja, odnosno binarne diobe i na taj način dijeljenja stanica u dvije identične stanične jedinice naziva se rast mikroorganizma. Generacijsko vrijeme je vrijeme koje je potrebno da mikroorganizam prođe kroz binarnu diobu počevši odmah nakon zadnjeg dijeljenja. To vrijeme ovisi o vrsti organizma i uvjetima rasta, a traje u prosjeku od 20 minuta (u idealnim uvjetima) do nekoliko sati ili dana (u lošijim uvjetima) (Abedon, 1998). Faktori koji utječu na rast mikroorganizama dijele se na vanjske (dostupnost  $O_2$ , temperatura, relativna vlažnost) i unutrašnje ( $a_w$ -vrijednost, pH, oksidoredukcijski potencijal, potrebe za hranjivim tvarima). Mikrobni rast je ujedno i eksponencijalni (logaritamski) rast koji matematički opisuje porast broja bakterijske populacije sa svakom novom generacijom. Svaki mikrobni rast ovisi o uvjetima okoliša ili uzgoja koji su osnovni faktor ograničavanja samoga rasta. Mnogi kemijski spojevi, minerali, ali i produkti metabolizma mikroorganizama imaju izraženo inhibitorno djelovanje na rast mikroorganizama, a između ostalih radi se i o mikotoksinima koji imaju toksične učinke na same stanice mikroorganizama. Bakterije se mogu razmnožavati na različite načine koristeći pritom različite mehanizme iako je svako takvo razmnožavanje nesporno.

Stanice se prije rasta moraju prilagoditi (adaptirati) na novu okolinu zato prijenosom mikroorganizma iz jednog medija u drugi neće doći do brzog odnosno trenutnog rasta i razmnožavanja stanica. Kada su okolišni uvjeti prikladni, započinje dijeljenje stanica, a potom i ubrzanje rasta. Stanice svojim rastom i razmnožavanjem mijenjaju hranjivu podlogu. Hranjivi sastojci i ostali materijali potrebni za respiraciju stanica se iscrpljuju, a zatim dolazi i do pada pH zbog nakupljanja ugljikova dioksida, kiselina i drugih metabolita (Duraković, 1991). Isto tako, zbog iskorištenosti zaliha energije i pada stupnja reprodukcije, dolazi do promjena samih stanica. Nakon rasta i potpunog sazrijevanja stanica, dolazi do sinteze različitih sekundarnih metabolita poput antibiotika i mikotoksina. Odumiranje mikroorganizama označava dugotrajno i stupnjevito opadanje broja stanica pa neke stanice ipak uspijevaju preživjeti određeno vrijeme (Nester i sur., 2004). Za mnoge vrste, život populacije prestaje s odumiranjem posljednje stanice, dok s druge strane, neke vrste mogu spriječiti ugibanje formiranjem endospora (Pommerville i Alcamo, 2006).



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Određivanje utjecaja dviju različitih koncentracija AFB<sub>1</sub> i ZEA na mikrobn rast i morfologiju provedeno je na bakterijama *L. plantarum* K1 i *L. plantarum* B, koje su dobivene iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, a *Leuconostoc mesenteroides* te *Pediococcus pentosaceus* iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

##### 3.1.2. Hranjive podloge bakterija mliječne kiseline

Za održavanje, čuvanje i uzgoj BMK te određivanje utjecaja mikotoksina na morfološke karakteristike i rast stanica BMK korišten je MRS (Man-Rogosa-Sharpe) bujon i agar (Biolife, Italija). Uzgoj bakterija proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37°C tijekom 24 sata.

a) MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – agar sastava: (g x L<sup>-1</sup>)

- pepton 10
- mesni ekstrakt 10
- kvašćev ekstrakt 5
- glukoza 20
- Tween 80 1
- MgSO<sub>4</sub>· 7 H<sub>2</sub>O 0,1
- MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05
- natrijev-acetat 5
- agar 20

- u destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 6,5

- sterilizacija pri 121°C/15 min.

b) MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – bujon

- istog je sastava kao podloga MRS-agar, samo bez dodanog agara i korištena je kao podloga za određivanje utjecaja AFB<sub>1</sub> i ZEA

### **3.1.3. Mikotoksini**

Standardi mikotoksina:

- AFB<sub>1</sub> „Sigma“ – St. Louis, MO, SAD
- ZEA „Sigma“ – St. Louis, MO, SAD

### **3.1.4. Aparatura**

- brojač kolonija (BZG30) WTW-Weilheim
- termostat Sutjeska, Beograd
- vibromikser EV-102, (Tehtnica, Železniki)
- vaga analitička
- svjetlosni mikroskop (Olympus)

### **3.1.5. Pribor**

- Erlenmeyer tikvice 250 mL
- Petrijeve zdjelice ø 10 cm
- pipete 1 i 10 mL
- epruvete mikrobiološke 18 × 180 mm
- mikropipete 10 i 100 µL JUSTOR 1100G
- okularni mikrometar
- objektni mikrometar
- Eppendorf epruvete (Eppendorf)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema otopina standarda mikotoksina AFB<sub>1</sub> i ZEA

Osnovne koncentracije od 2,5 mg/mL za AFB<sub>1</sub> i 10 mg/mL za ZEA pripremljene su otapanjem kristaliničnog mikotoksina u etanolu i pohranjene na 4 °C do daljnjih analiza. Radne koncentracije odabranih mikotoksina upotrijebljenih u pokusima pripremljene su u mediju za rast BMK, i to 10 i 20 µg/mL za AFB<sub>1</sub>, te 50 i 75 µg/mL za ZEA.

### 3.2.2. Priprema uzoraka

*Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus* čuvaju se u MRS-bujonu pri 4 °C, u hladnjaku. Kulture se precjepljuju svakih 14 dana i inkubiraju pri 37°C te su korištene za određivanje utjecaja mikotoksina (AFB<sub>1</sub> i ZEA) različitih koncentracija na preživljavanje i morfološke karakteristike bakterija u tekućoj podlozi.

Suspenzija prekonoćne odabrane bakterijske kulture dodana je u Erlenmayer- tikvice s 20 mL MRS bujona kako slijedi:

Tikvica A – kontrola (bujon, bakterija i etanol)

Tikvica B – bujon, bakterija i 20 µg/mL AFB<sub>1</sub>

Tikvica C – bujon, bakterija i 10 µg/mL AFB<sub>1</sub>

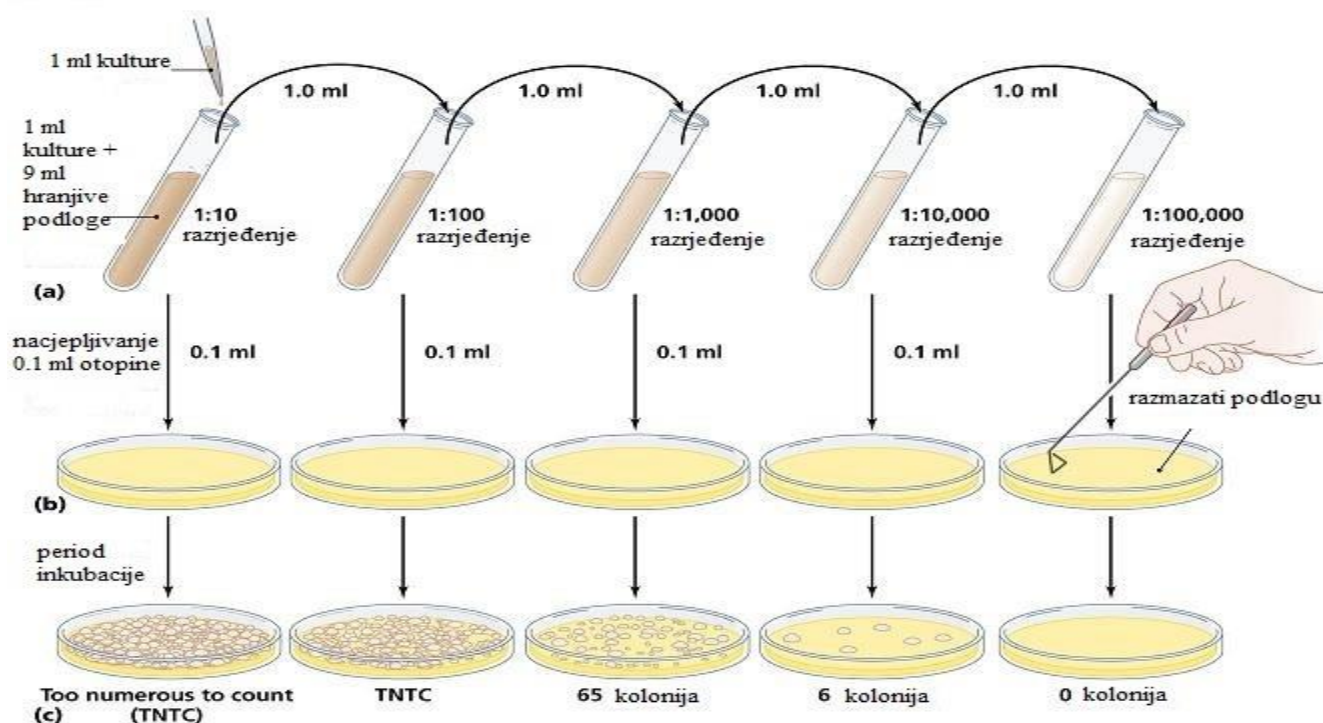
Tikvica D – bujon, bakterija i 75 µg/mL ZEA

Tikvica E – bujon, bakterija i 50 µg/mL ZEA

## 2.3.Određivanje broja živih stanica BMK

Utjecaj AFB<sub>1</sub> (10 i 20 µg/mL) i ZEA (50 i 75 µg/mL) na rast odabranih BMK u hranjivoj podlozi određen je metodom neizravnog (posrednog) određivanja broja živih mikrobnih stanica tijekom 24 sata uzgoja. Uzorci su uzimani svaka 2 sata tijekom 10 sati te nakon 24. sata i načinjene su serije decimalnih razrjeđenja (slika 3) u omjeru 1:10. 100 µL suspenzije nacijepljeno je na MRS

podlogu u Petrijevim zdjelicama te stavljeno na inkubaciju 48 h na 37°C. Svi pokusi su provedeni u paraleli.



**Slika 3.** Priprema serije decimalnih razrjeđenja (Anonymus 1, 2017)

Kolonije mikroorganizama koje su porasle na čvrstoj hranjivoj podlozi predstavljaju broj živih stanica te su prebrojane na brojaču kolonija. Izbrojane vrijednosti izražavaju se kao CFU vrijednost (Colony Forming Units) (formula 1) (Duraković i Duraković, 1998).

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad [1]$$

### 3.2.4. Mikrometrija

Mikrometrija je znanost koja se bavi mjerenjem dimenzija stanica i ako je moguće, njihovih komponenti. Sa svjetlosnim mikroskopom mjerenje se provodi pomoću okularnog i objektnog mikrometra. Objektni mikrometar je stakalce koje u centru ima ugraviranu skalu dugačku 1 mm podijeljenu na 100 jednakih podjeljaka. Stoga, razmak između dva manja podjeljka objektnog mikrometra iznosi 0,01mm (slika 4). Okularni mikrometar je stakalce koje u sredini sadrži ugraviranu skalu označenu brojevima, ali vrijednost svake podjele je nepoznata (Mehrota i Sumbali, 2009) (slika 4).

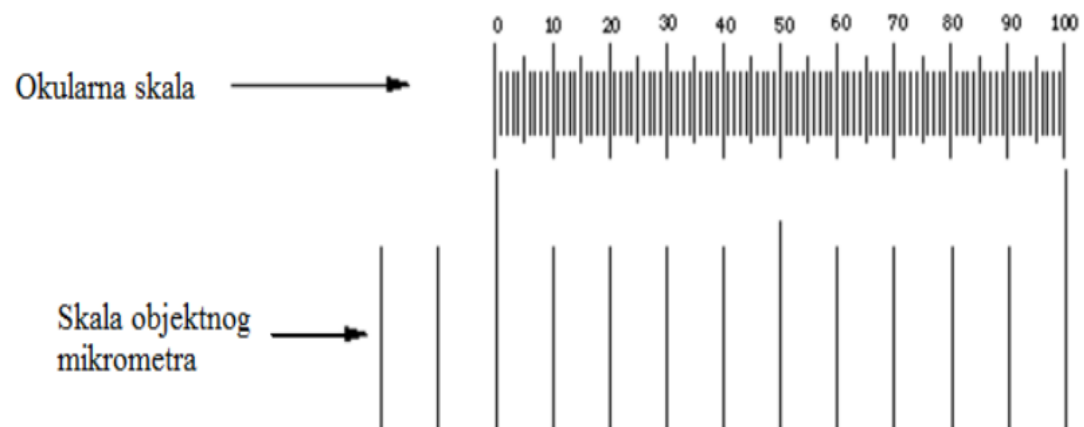
Prije mjerenja dimenzije stanica, potrebno je izbaždari okularni mikrometar. Okularni mikrometar se stavi u okular mikroskopa, a objektni mikrometar na stolić mikroskopa. Baždarenje se provodi pod povećanjem pod kojim se promatra određeni predmet. Za bakterije baždarenje je potrebno provesti pri povećanju od 1000x uz upotrebu imerzijskog ulja, tako da se odredi broj podjeljaka objektna skale koji odgovara 100-tom ili n-tom podjeljku okularne skale. Faktor povećanja okularnog mikrometra dobije se tako da se broj podjeljaka objektna skale podjeli sa 100 podjeljaka okularne skale i pomnoži sa 10 (formula 2). Za svaku kombinaciju mikroskopa, objektnog i okularnog mikrometra potrebno je provesti baždarenje (Duraković, Duraković, 2001).

$$F_{1000} = \frac{a}{b} \times 10 \quad [2]$$

gdje je:  $a$  broj podjeljaka objektna skale

$b$  broj podjeljaka okularne skale

Nakon što je provedeno baždarenje, na stolić mikroskopa se stavi pripremljeni preparat bakterija, a okularni mikrometar ostaje u okularu i izmjeri se koliko podjeljaka na okularnoj skali zauzima mikroorganizam i pomnoži s faktorom povećanja te se na taj način dobije veličina određenog mikroorganizma.



**Slika 4.** Skala okularnog i objektnog mikrometra  
(Anonymus 2, 2015)

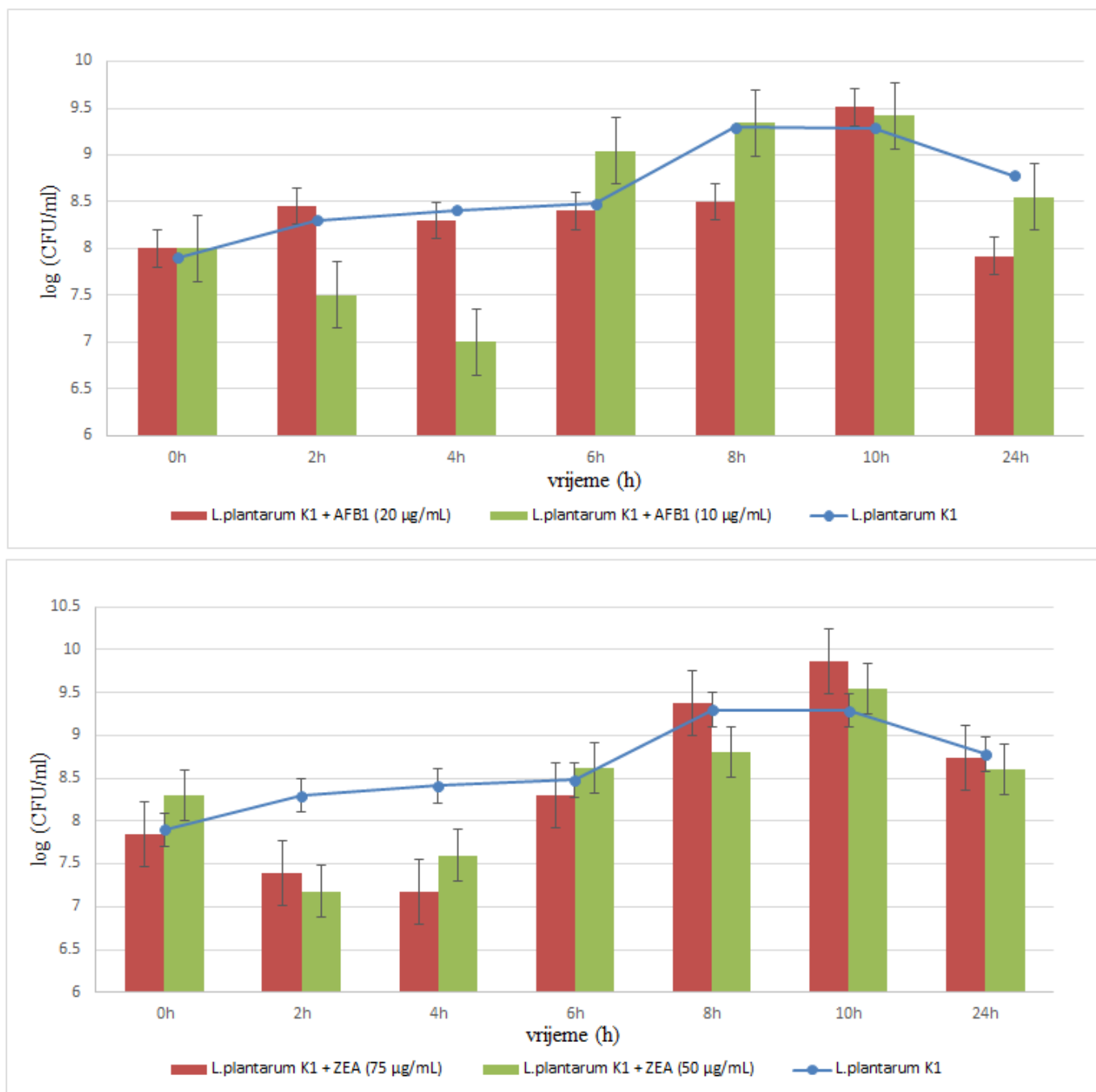
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Mikrobni rast ovisi o uvjetima okoline u kojoj se mikroorganizmi nalaze kao i izloženosti kemijskim agensima, a toksično djelovanje mikotoksina najčešće se očituje kroz inhibiciju rasta. Mikotoksini su sveprisutni, a nalaze se i u sirovinama (mlijeko, meso) za proizvodnju fermentiranih namirnica. Tijekom proizvodnje fermentirane hrane BMK imaju ključnu ulogu u tvorbi okusa, mirisa, nutritivnih karakteristika, međutim, njihova aktivnost može biti smanjena zbog utjecaja mikotoksina prisutnih u sirovinama. Stoga je u ovom radu istražen utjecaj AFB<sub>1</sub> i ZEA na broj živih stanica i morfološke osobine bakterija *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus* potencijalnih starter kultura za proizvodnju fermentirane hrane.

### 4.1. Utjecaj mikotoksina na rast BMK

Rast bakterija uz prisustvo i bez prisustva mikotoksina AFB<sub>1</sub> i ZEA određen je neizravnom metodom određivanja broja živih stanica, brojenjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi (MRS) u Petrijevoj zdjelici tijekom 24 sata. Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 5-8.

Iz dobivenih rezultata u kontrolnim uzorcima za sve odabrane BMK vidljivo je da rast stanica oblikuje krivulju rasta bakterija. Maksimalan broj stanica za *L. plantarum* K1 (9,3 log CFU/mL) i *Leuc. mesenteroides* (9,15 log CFU/mL) dobiven je u 8. satu, za *L. plantarum* B u 10. satu (9,22 log CFU/mL), dok je za *P. pentosaceus* taj broj iznosio 9,15 log CFU/mL i zabilježen je nakon 24 sata uzgoja.



**Slika 5.** Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na rast bakterije *L. plantarum* K1 pri 37°C tijekom 24 sata uzgoja

Kod uzoraka s dodanim AFB<sub>1</sub> u koncentraciji od 10 µg/mL vidi se da je rast *L. plantarum* K1 inhibiran samo tijekom prva 4 sata trajanja pokusa za oko 17% nakon čega od 6. do 10. sata

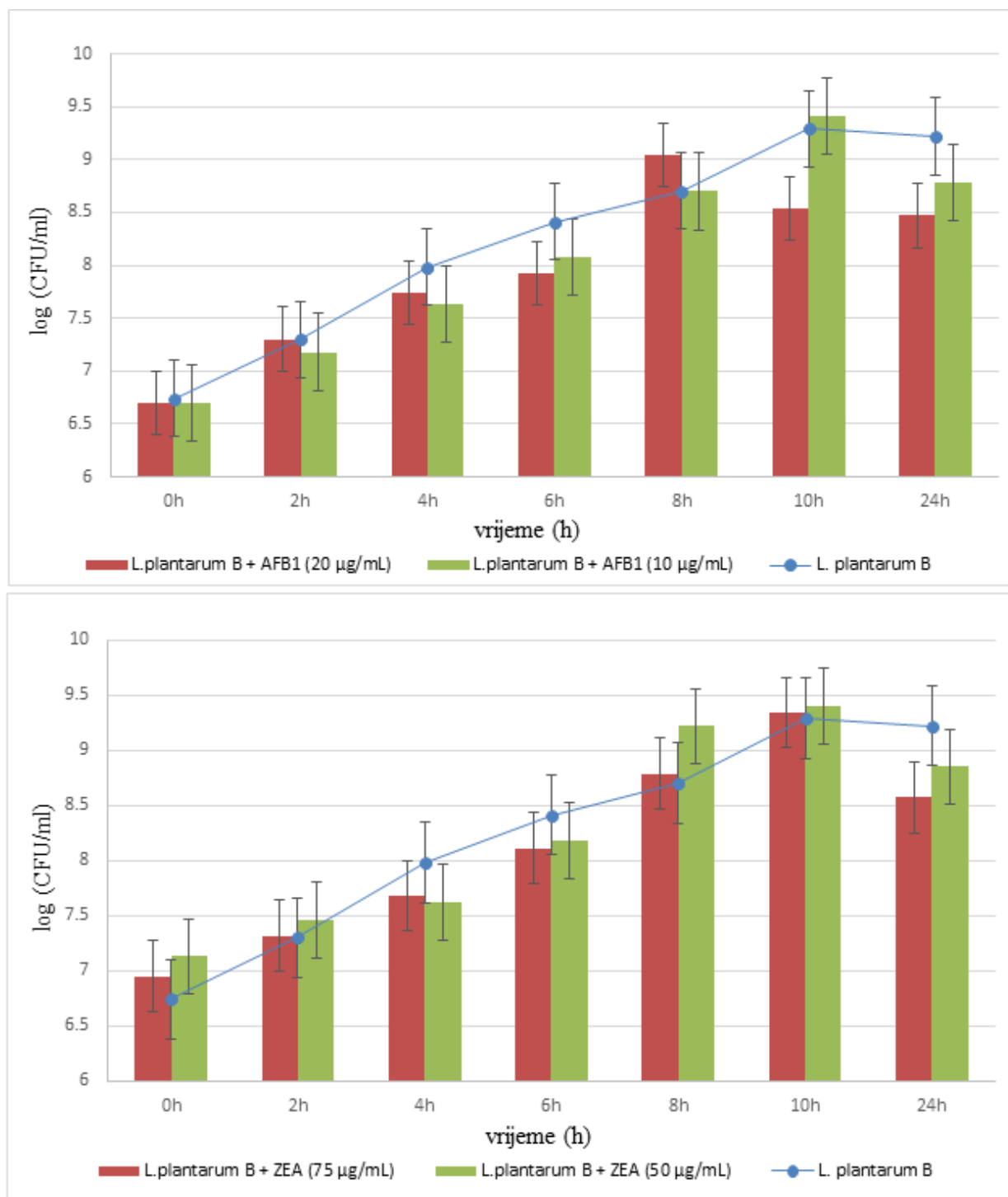


dolazi do stimulacije rasta, da bi nakon 24. sata ponovo bio zabilježen pad broja živih stanica. Rast *L. plantarum* K1 uz 20 µg/mL AFB<sub>1</sub> prati rast kontrolnog uzorka sve do 8. sata kada je vidljiva inhibicija rasta za oko 8 %, a u 10. satu je zabilježen maksimalan broj stanica od 9,51 log CFU/mL koji nakon 24 sata pada na 7,92 CFU/mL (slika 5).

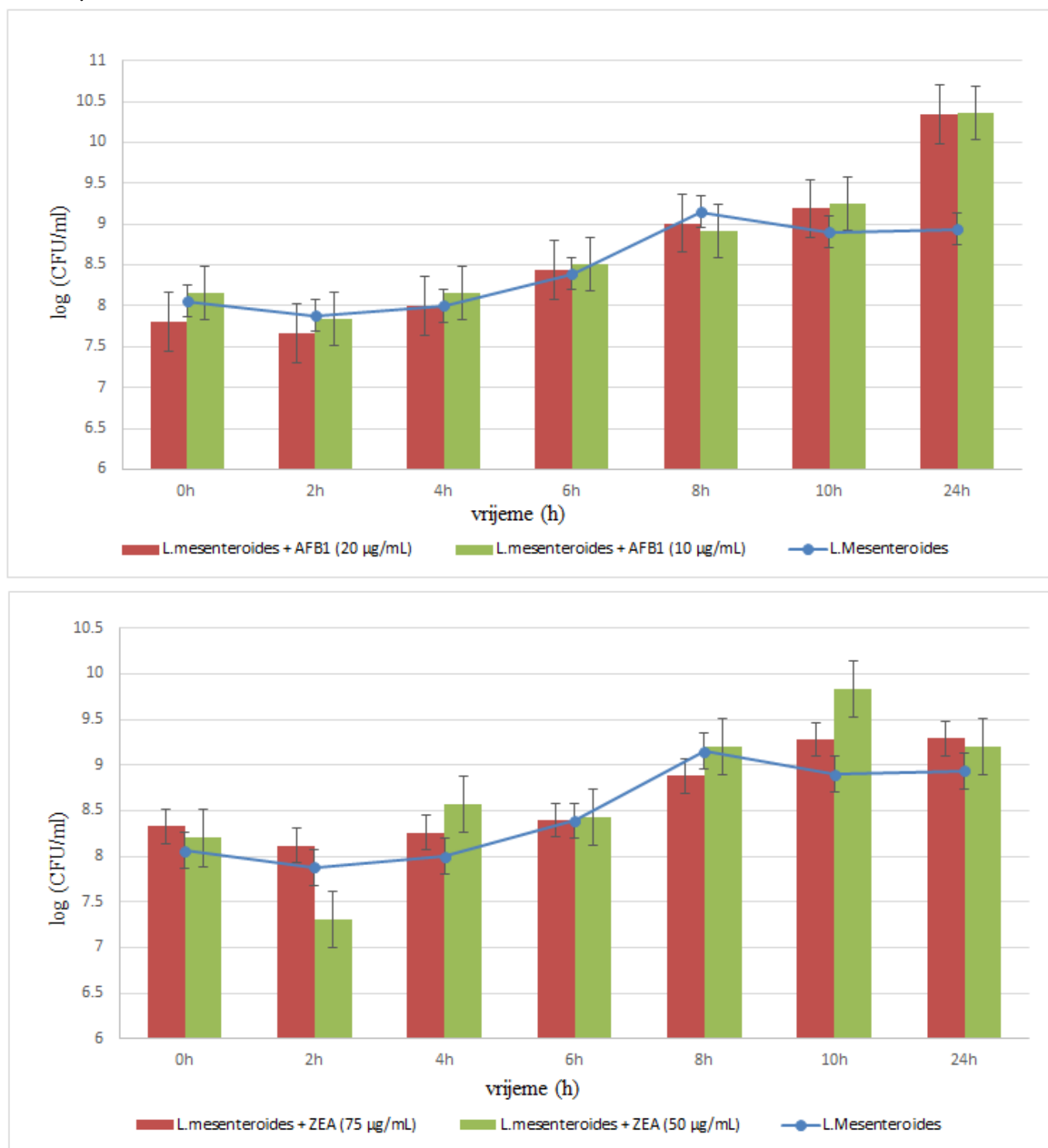
Inhibitorni učinak ZEA na rast bakterije *L. plantarum* K1 očituje se tijekom prva 4 sata pri obje upotrijebljene koncentracije. Broj živih stanica bakterija se smanjio za 14% i 13% pri koncentraciji ZEA od 75 µg/mL odnosno 50 µg/mL. Nakon 6. sata dodatak ZEA neovisno o dodanoj koncentraciji nema značajniji utjecaj na rast bakterije u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Maksimalan broj bakterija od 9,88 i 9,55 log CFU/mL zabilježen je u 10. satu za 75 odnosno 50 µg/mL ZEA (slika 5).

Na slici 6 je vidljivo da AFB<sub>1</sub> tijekom 6 sati trajanja pokusa pokazuje slabo inhibitorno djelovanje na rast bakterije *L. plantarum* B od 4% pri 20 µg/mL odnosno 4% pri 10 µg/mL AFB<sub>1</sub>. Nakon 8. sata uzgoja u pokusima s 20 µg/mL zabilježen je najveći broj stanica bakterija od 9,04 log CFU/mL dok je broj od 9,41 log CFU/mL dobiven u uzorku s 10 µg/mL nakon 10. sata kada je i u kontrolnom uzorku dobiven maksimalan broj stanica.

Kod uzoraka s dodanim ZEA, obje istraživane koncentracije (75 i 50 µg/mL) pokazuju slični učinak na rast *L. plantarum* B sve do 8. sata kada niža koncentracija ZEA pospješuje stimulaciju rasta bakterije. Maksimalan broj stanica u uzorcima s dodanim ZEA je zabilježen u 10. satu kao i za kontrolni uzorak i iznosio je 9,34 log CFU/mL za 75 µg/mL ZEA i 9,4 log CFU/mL za 50 µg/mL ZEA (slika 6).



**Slika 6.** Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na rast bakterije *L. plantarum* B pri 37°C tijekom 24 sata uzgoja



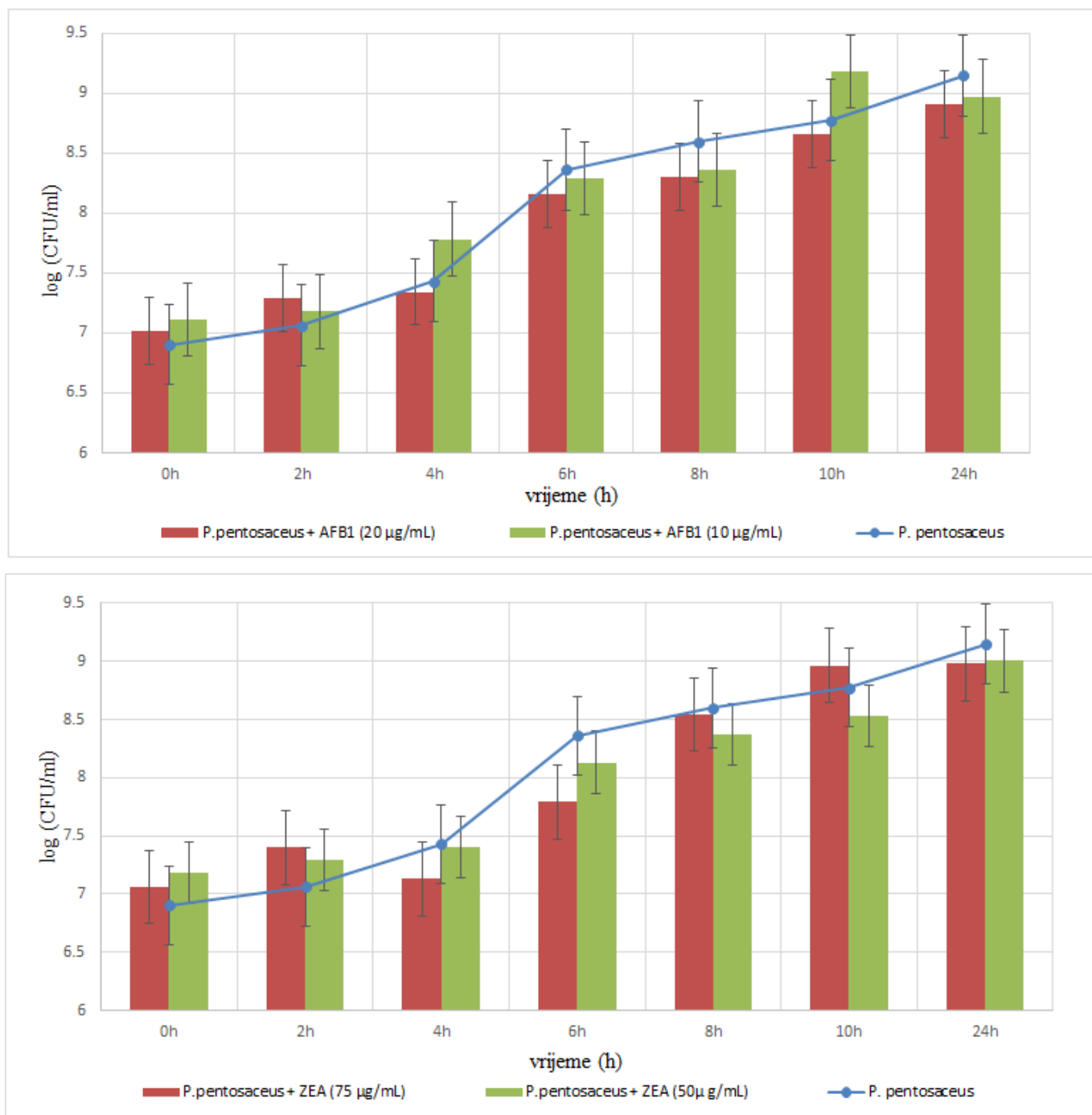
**Slika 7.** Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na rast bakterije *L. mesenteroides* pri 37°C tijekom 24 sata uzgoja

Iz rezultata prikazanih na slici 7 vidljivo je da rast bakterije *Leuc. mesenteroides* uz prisustvo obje koncentracije AFB<sub>1</sub> prati rast bakterije u kontrolnom uzorku odnosno nije uočena inhibicija rasta tijekom čitavog vremena trajanja pokusa već naprotiv od 10. sata bilježi se stimulacija rasta. U uzorcima s dodanim ZEA uočava se slično ponašanje kao kod AFB<sub>1</sub>, odnosno ZEA nema značajniji utjecaj na rast bakterije u usporedbi s kontrolnim uzorkom.

Najveći broj stanica zabilježen je u 24. satu i iznosio je 10,34 i 10,36 log CFU/mL za uzorke s 20 µg/mL i 10 µg/mL dodanog AFB<sub>1</sub> iz čega možemo zaključiti da AFB<sub>1</sub> u zadanim koncentracijama uopće nije djelovao inhibitorno na rast bakterije već stimulativno uspoređujući s kontrolom. Za razliku od AFB<sub>1</sub>, u uzorcima sa 75 i 50 µg/mL dodanog ZEA najveći broj stanica dokazan je u 10. satu i iznosio je 9,28 i 9,83 log CFU/mL (slika 7).

Utjecaj AFB<sub>1</sub> i ZEA na rast bakterije *Pediococcus pentosaceus* prikazan je slici 8. Kod uzoraka s dodanim AFB<sub>1</sub> vidi se da bakterijski rast pri obje koncentracije mikotoksina prati krivulju rasta bakterije u kontroli tijekom 6 sati uzgoja. Od 8. sata pokusa zabilježena je inhibicija rasta od 4% za 20 µg/mL odnosno 3% za 10 µg/mL, nakon čega se inhibicija rasta nastavlja samo u uzorku sa AFB<sub>1</sub> u koncentraciji od 20 µg mL<sup>-1</sup> do 24-og sata tj. do kraja provođenja eksperimenta (slika 8).

ZEA u koncentraciji od 75 µg/mL utječe stimulativno tijekom prva 2 sata, a zatim se broj stanica bakterija *Pediococcus pentosaceus* smanjuje za oko 4% sve do 8. sata nakon čega je ponovo zabilježena stimulacija rasta u 10. satu uzgoja. Koncentracija ZEA od 50 µg/ mL pokazuje inhibitoran učinak na rast *Pediococcus pentosaceus* od 4. sata inkubacije pa do kraja eksperimenta (24 h) (slika8).



**Slika 8** . Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na rast bakterije *Pediococcus pentosaceus* pri 37°C tijekom 24 sata uzgoja

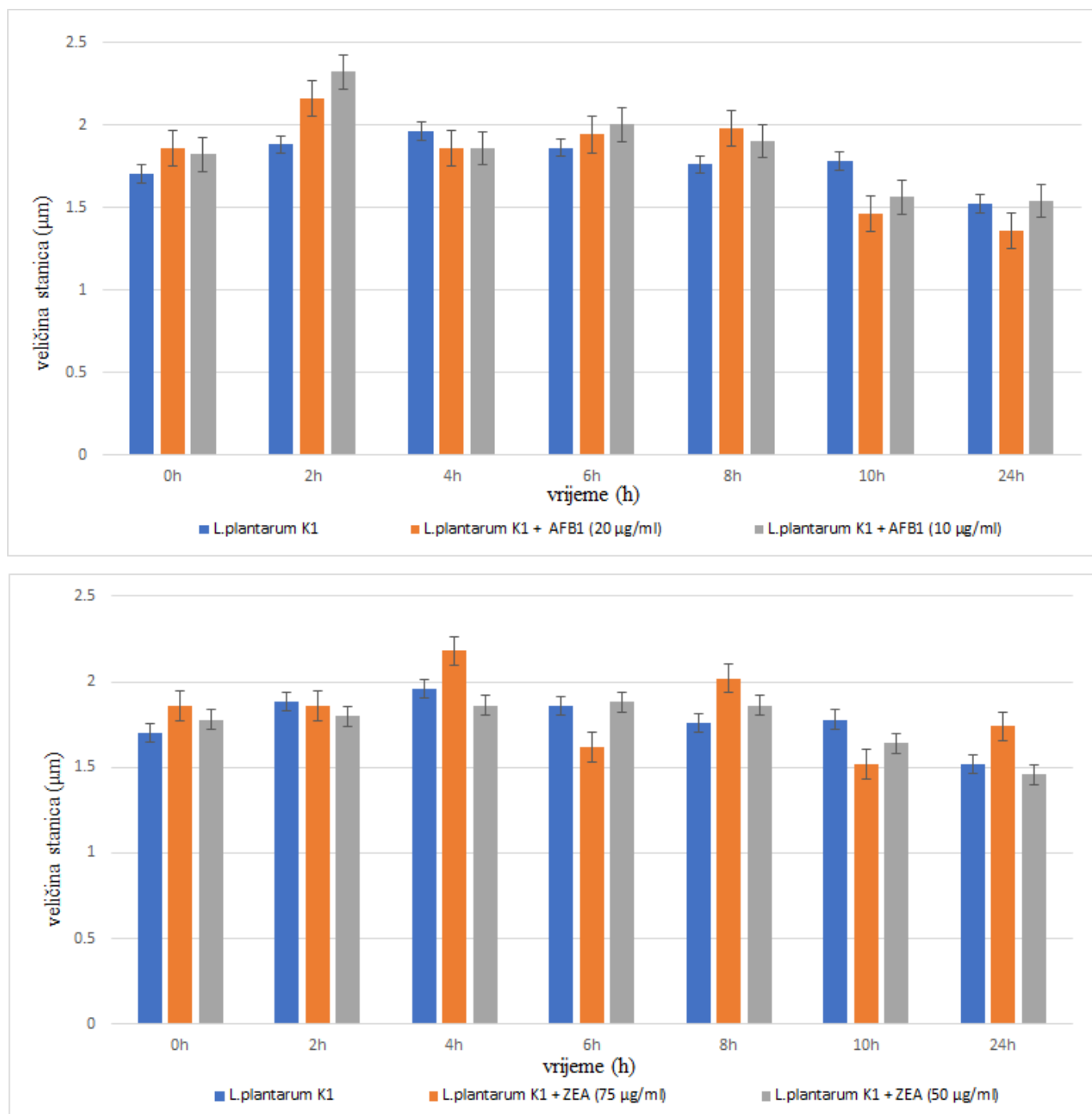
Maksimalan broj stanica u uzorcima s dodanim 20 µg/mL i 10 µg/mL AFB<sub>1</sub> iznosio je 8,91 log CFU/mL u 24. satu odnosno 9,18 log CFU/mL u 10. satu. U uzorcima s dodanim ZEA, najveći broj stanica za oba uzorka je uočen u 24. satu i iznosio je 8,98 i 9 log CFU/mL pri 75 µg/mL odnosno 50 µg/mL ZEA (slika 8).

Iz prikazanih rezultata (slike 5- 8) vidljivo je da dodatak mikotoksina AFB<sub>1</sub> i ZEA nema značajniji utjecaj na rast odabranih BMK.

Dobiveni rezultati su u suglasju s istraživanjima nekolicine autora koji su ispitivali toksičnost AFB<sub>1</sub> na različite bakterije (Mathur i sur. 1976; Westlake i sur. 1987) Westlake i sur. (1987) ispitivali su toksičnost AFB<sub>1</sub> na rast četiri različita soja bakterije *Butyrivibrio fibrisolvens*. Dobiveni rezultati pokazali su da dodatak 10 µg/mL AFB<sub>1</sub> ne djeluje toksično prema ispitivanim bakterijama. Isti autori ispitivali su toksičnost različitih mikotoksina (DAS, DON, ZEA, OTA, T-2) na bakteriju *B. fibrisolvens* CE 51 te zaključili da testirani mikotoksini ne utječu na rast bakterije, ali da dolazi do njihove razgradnje. U istraživanjima Šutić i sur. (1983) dokazano je da AFB<sub>1</sub> zaustavlja rast nekih bakterija mliječne kiseline i da su te promjene u broju stanica uglavnom nepovoljne za industrijsku preradu mlijeka u različite proizvode od mlijeka. Do sada je proveden malen broj istraživanja o učinku mikotoksina na stanice bakterija.

#### **4.2. Utjecaj mikotoksina na morfološke osobine BMK**

Promjena u veličini stanica bakterija u ovisnosti o vremenu kontakta između bakterija i mikotoksina vidljiva je u uzorcima s dodanim AFB<sub>1</sub> i ZEA u odnosu na kontrolni uzorak. Eksperimenti su provedeni tijekom 24 sata u paralelama. Metodom mikrometrije praćene su promjene morfoloških osobina stanica primarno mjerenjem veličine stanica. Veličina stanica određena je mikroskopiranjem bakterija pod povećanjem od 1000x, uz imerzijsko ulje i uz upotrebu okularnog i objektnog mikrometra. Za svako je mjerenje nasumično odabrano 50 stanica u uzorku, a rezultati su prikazani na slikama 9-12.

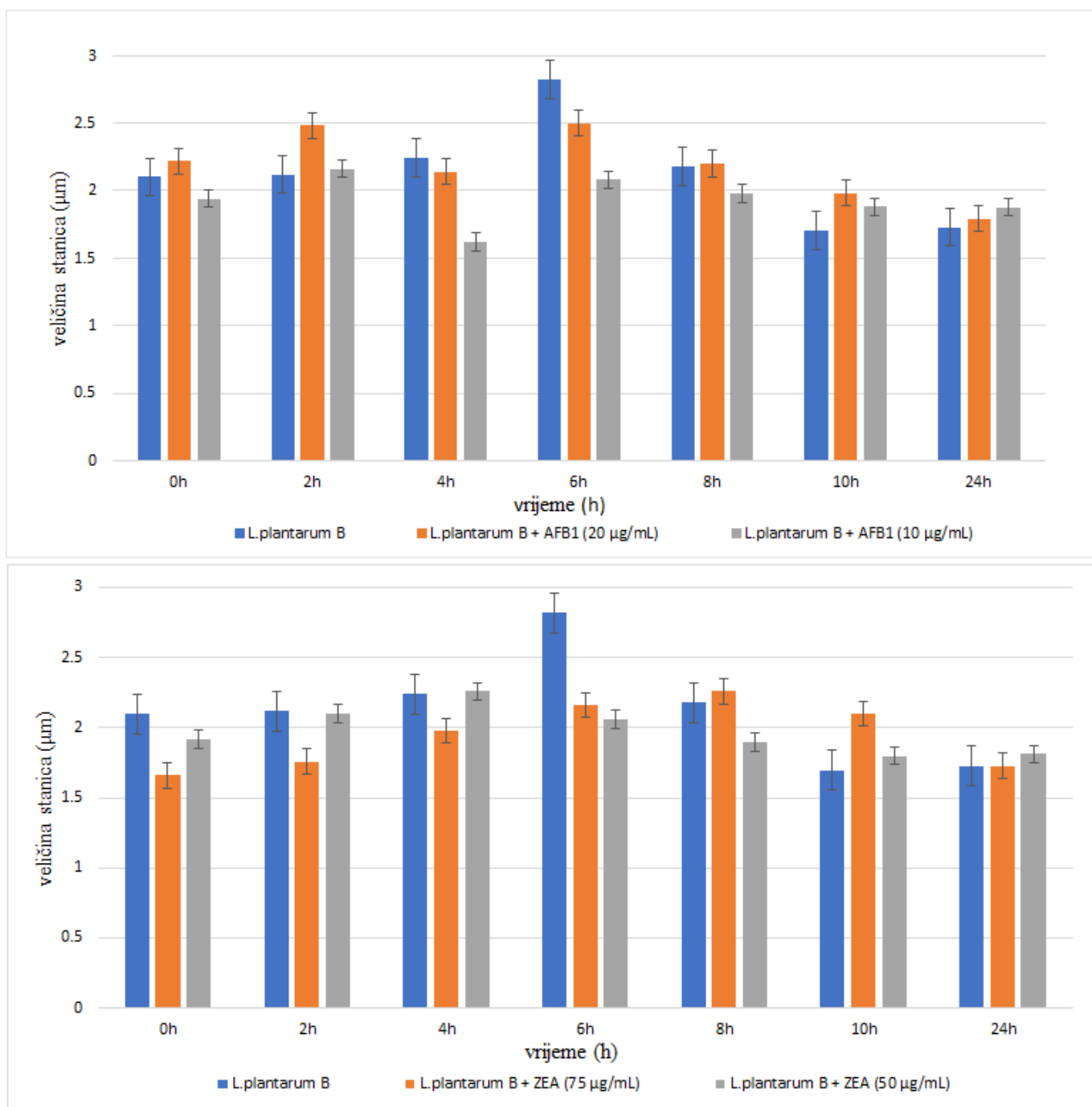


**Slika 9.** Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na veličinu *L. plantarum* K1 tijekom 24 h

Na slici 9 prikazan je utjecaj AFB<sub>1</sub> na promjenu veličine stanica bakterije *L. plantarum* K1. AFB<sub>1</sub> u obje koncentracije različito djeluje na stanice bakterija. Najveće promjene uočene su za stanice u prisutnosti 20 µg/mL AFB<sub>1</sub> u 2. i 8. satu gdje je uočeno povećanje dimenzija stanice za



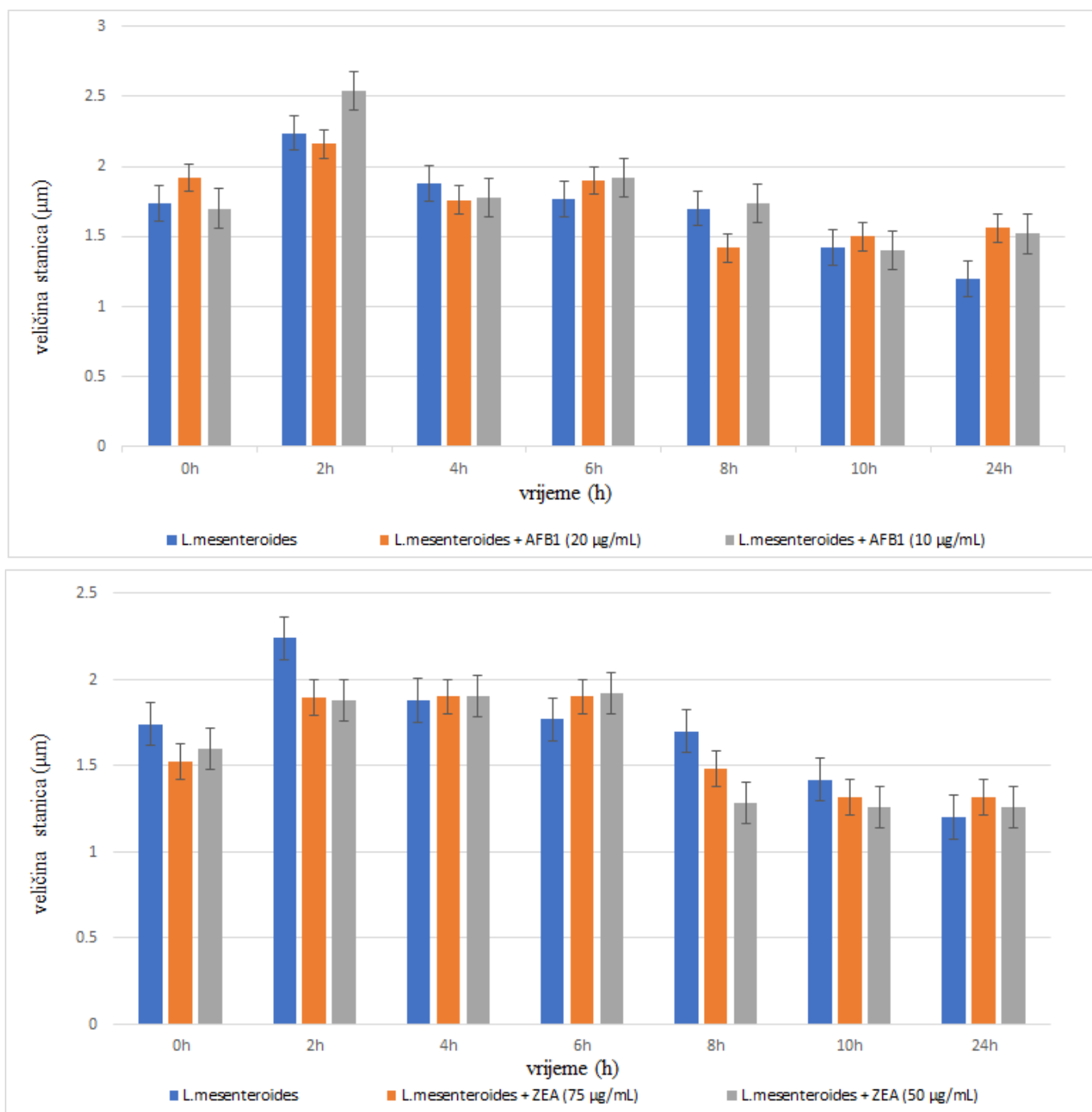
13% i 11% u odnosu na kontrolni uzorak u istom satu. No u 10. i 24. satu vidljivo je smanjenje dimenzija stanica za 18% i 11%. Uzorak s dodanim 10 µg/mL AFB<sub>1</sub> u 2. satu pokazuje najveće povećanje dimenzije stanica u odnosu na kontrolu i to za 19%, a jedino zabilježeno smanjenje stanice je u 4. satu za 5% nakon čega je ponovno vidljiv rast stanice sve do 10. sata kada je zabilježeno smanjenje od 13% u odnosu na kontrolni uzorak. Uzorak s dodanim 75 µg/mL ZEA pokazuje povećanje i smanjenje dimenzija svaka 2 sata u prosjeku za 10% dok manja koncentracija od 50 µg/mL ZEA ne pokazuje značajan utjecaj na dimenzije.



**Slika 10.** Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na veličinu *L. plantarum* B tijekom 24 h

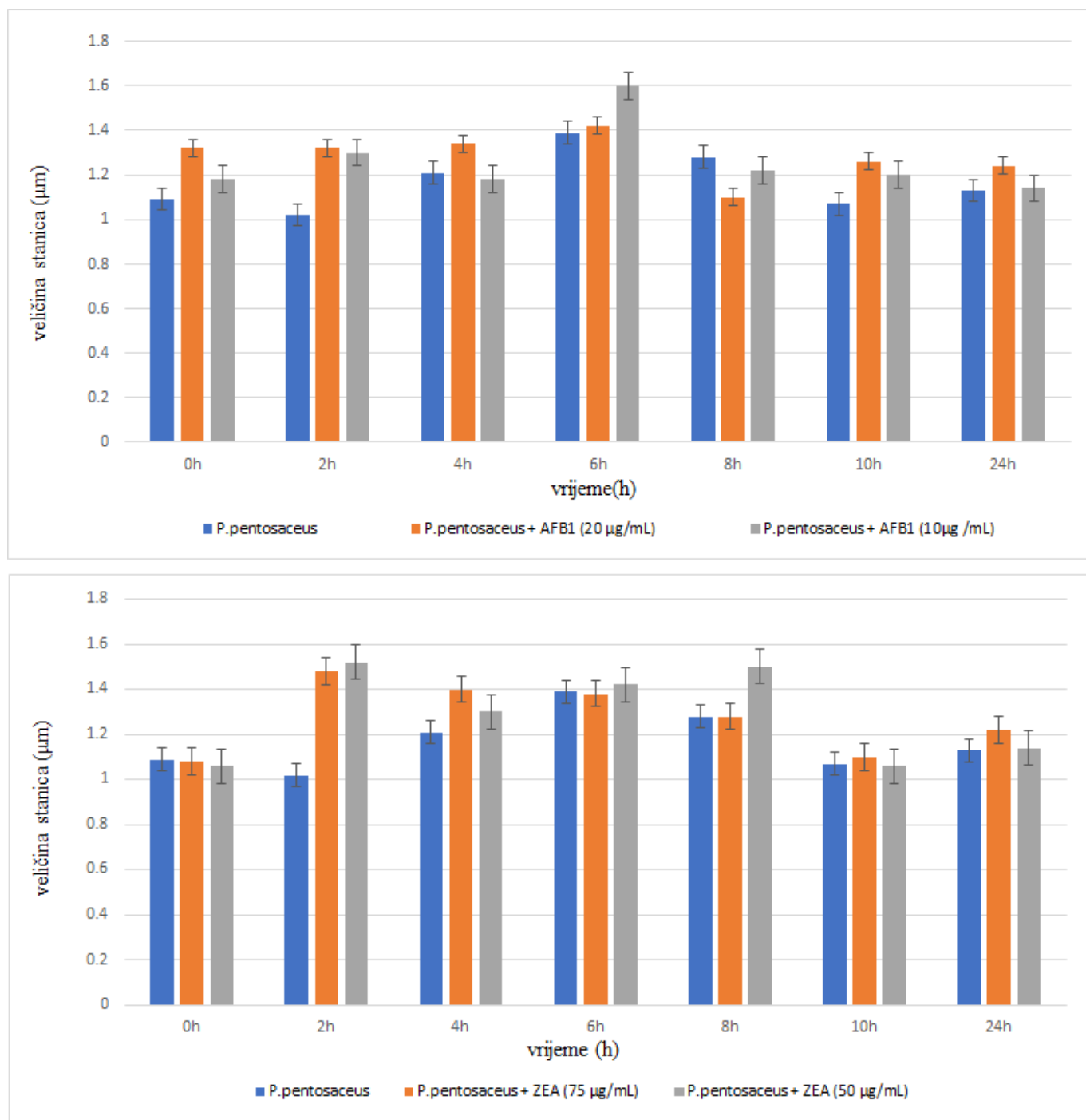
Tijekom prva dva sata inkubacije a zatim od 8. do 24. sata stanice bakterije *L. plantarum* B u prisutnosti 20 µg/mL AFB<sub>1</sub> u prosjeku su nešto veće od stanica u mediju bez dodanog toksina (kontrola). Značajno smanjenje za 12% vidljivo je samo u 6. satu u usporedbi s kontrolom. Kod uzorka s 10 µg/mL AFB<sub>1</sub> veličina stanica čitavo vrijeme uzgoja manja je od kontrole, a najznačajnije smanjenje veličine dobiveno je u 4. satu kada je veličina stanica u odnosu na kontrolu smanjena za 28% (slika 10).

Za razliku od AFB<sub>1</sub>, koncentracija od 75 µg/mL ZEA već u 0. satu pokazuje smanjenje veličine stanice za 21% koje se uočava sve do 8. sata kada je zabilježeno povećanje stanica koje se zadržava do 24. sata. U usporedbi s kontrolom, koncentracija od 50 µg/mL ZEA negativno utječe na veličinu stanica sve do 10. sata kada je uočeno neznatno povećanje bakterijske stanice (slika 10).



**Slika 11** . Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na veličinu *L. mesenteroides* tijekom 24 h

Na slici 11 vidljivo je da i AFB<sub>1</sub> i ZEA u obje istraživane koncentracije utječu na veličinu stanica bakterije *L. mesenteroides* no nije jasno kojim mehanizmom djeluju na morfologiju stanica budući da naizmjenično dolazi do povećanja odnosno smanjenja veličine stanica. Najveća promjena u veličini uočava se u 8. satu kada je izmjereno da su stanice u prosjeku manje za 13 i 25% za uzorke sa 75 µg/mL ZEA odnosno 50 µg/mL ZEA (slika 11).



**Slika 12.** Utjecaj AFB<sub>1</sub> u koncentracijama 20 i 10 µg/mL (gore) i ZEA u koncentracijama 75 i 50 µg/mL (dolje) na veličinu *P. pentosaceus* tijekom 24 h

Rezultati utjecaja AFB<sub>1</sub> na veličinu stanica bakterije *P. pentosaceus* prikazani na slici 12 pokazuju da su u svim mjerenjima osim u 8 satu stanice veće u odnosu na kontrolu. Mikotoksin ZEA u obje dodane koncentracije (75 i 50 µg/mL) ne pokazuje značajan utjecaj na veličinu stanica jer su dimenzije stanica u uzorcima s dodanim mikotoksinom u 0., 6., 10. i 24. satu podjednake dimenzijama stanica u kontroli. Najveća razlika u veličini stanica između kontrolnog uzorka i uzoraka tretiranih s toksinom uočava se u 2. satu kada dolazi do povećanja stanica za oko 30% u prisutnosti 75 i 50 µg/mL ZEA.

Iz rezultata prikazanih na slikama 9-12 vidljivo je da AFB<sub>1</sub> i ZEA utječu na veličinu stanica odabranih BMK iako nije jasno vidljiv trend kojim mikotoksini utječu na morfologiju stanica. U istraživanjima Šutić i Banina (1979) dokazan je utjecaj aflatoksina na morfološke i fiziološke karakteristike bakterija mliječne kiseline no do danas je proveden malen broj istraživanja o utjecaju mikotoksina na mikroorganizme općenito. Autori navode da ovisno o primijenjenoj koncentraciji mikotoksina te duljini izlaganja dolazi do promjena stanica BMK, a takve su promjene uglavnom nepoželjne. Rezultati istraživanja su pokazali su u prisutnosti AFB<sub>1</sub> zapažene promjene u dimenzijama stanica i da su kod štapićastih bakterija štapići duži i širi, a kod okruglih BMK mijenja se broj stanica u lancu, ovisno o primijenjenoj koncentraciji, duljini vremena djelovanja, ali i vrsti, odnosno soju BMK (Šutić i Banina, 1979; Šutić i sur., 1983).

Naizmjenično povećanje i smanjenje bakterijskih stanica ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti stanica mikotoksinima ukazuje na mogućnost da BMK imaju sposobnost vezanja mikotoksina što se podudara s rezultatima istraživanja Haskard i sur. (2001), Markov i sur. (2010), Muñoz i sur. (2010), Zinedine i sur., (2007), El-Nezami i sur. (2002) koji su dokazali da bakterije roda *Lactobacillus* imaju sposobnost vezanja AFB<sub>1</sub> i ZEA u mediju u kojem se nalaze. Uočeno je da je mehanizam vezanja toksina reverzibilni proces jer je duljim kontaktom bakterija-mikotoksin došlo do otpuštanja dijela vezanog mikotoksina natrag u podlogu, pa i to može biti jedan od razloga oscilacijama u veličini stanica bakterija u prisutnosti AFB<sub>1</sub> i ZEA.

Vezanje i otpuštanje mikotoksina na bakterije mliječne kiseline još nije u potpunosti objašnjeno, no predloženo je da su peptidoglikan i slične strukture uključene u proces vezanja mikotoksina (Lahtinen i sur., 2004). Iz rezultata je vidljivo da se kontakt između bakterija i mikotoksina tijekom vremena mijenja što se očituje kroz naizmjeničnu promjenu veličine stanica

bakterija, ali i da AFB<sub>1</sub> i ZEA ne djeluju jednako na različite vrste BMK, pa čak ni na različite sojeve iste vrste.



## 5. ZAKLJUČCI

Područje istraživanja utjecaja mikotoksina na rast i morfologiju bakterija mliječne kiseline još uvijek je novo i potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se u potpunosti objasnila. Iz rezultata dobivenih prilikom izrade ovog rada o utjecaju aflatoksina B<sub>1</sub> i zearalenona na BMK može se zaključiti da:

1. Aflatoksin B<sub>1</sub> i zearalenon pokazuju slab učinak na rast i morfološke karakteristike bakterija *L. plantarum* K1, *L. plantarum* B, *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus*.
2. Prilikom ispitivanja, uočeno je da se BMK, nakon nekog vremena, prilagođavaju sredini u kojoj su prisutni mikotoksini.
3. Utjecaj na broj i veličinu stanica BMK ovisi o primijenjenoj koncentraciji i vremenu djelovanja mikotoksina, ali i o samom soju korištene BMK.
4. Povećanje veličine stanica u početnim satima može se pripisati vezanju mikotoksina na površinu stanice, dok dužim vremenom izlaganja okolini s mikotoksinom dolazi do smanjenja veličine stanica zbog otpuštanja mikotoksina s mjesta vezanja.
5. Oba mikotoksina, iako imaju vrlo slab utjecaj na rast i razvoj stanica BMK, mogu uzrokovati promjene u metaboličkoj aktivnosti BMK, čime mogu utjecati na kvalitetu fermentiranih proizvoda, ali i na ekonomičnost proizvodnje pa bi utjecaj mikotoksina na proizvodnju ključnih metabolita BMK odgovornih za senzorske i fizikalno-kemijske karakteristike fermentirane hrane trebalo dodatno ispitati.

## 6. LITERATURA

Abedon, S. T. (1998) Stephen T. Abedon, Ph.D. – Home Page, <<http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol2025.htm>>. Pristupljeno 11. svibnja 2017.

Aguilar-Uscanga, B., Francois, J. M., (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* **37**, 268–274.

Anonymus 1 (2017) *Microbal Growth, decimal dilutions*, <[http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/4\\_growth/index.bak](http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/4_growth/index.bak)>. Pristupljeno 30. kolovoza 2017.

Anonymus 2 (2015) Biology Notes For A level, Microscopy, <<http://biology4alevel.blogspot.hr/2014/07/2-cell-structure-microscopy.html>>. Pristupljeno 30. kolovoza 2017.

Axelsson, L. (2012) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. U: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 4. izd. (Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von Wright, A., ured.), CRC Press, Taylor Francis Group, LLC., Boca Raton, str. 1-67.

Bennett, J. W., Klich, M. (2003) Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.* **16**(3), 497–516. doi: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003.

Dalić, D. K. D., Deschamps, A. M., Richard-Forget, F. (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review, *Food Control.* **21**(4), 370–380. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.011.

Dimic, G. (2006) Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables, *Acta periodica technologica.* **37**, 3–11. doi: 10.2298/APT0637003D.

Ducrotté P., Sawant P., Jayanthi V. (2012) Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM

9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* **18**, 4012-4018.

Duraković, S. (1991) Prehrambena mikrobiologija. Medicinska naklada., Zagreb.

Duraković, S., Duraković, L. (2001) Mikrobiologija namirnica-osnove i dostignuća. Kugler, Zagreb.

Duraković, S., Duraković, L. (2003) Mikologija u biotehnologiji. Kugler, Zagreb.

El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food Chem. Toxicol.* **36**(4), 321–326.

El-Nezami, H. S., Polychronaki, N., Salminen, S., Mykkänen, H. (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α-zearalenol. *Appl Environ. Microbiol.* **68**, 3545–3549.

Foszczyńska B. , Dziuba E. , Chmielewska J. , Kawa-Rygielska J. (2008) Effect of DAS, ZEA and OTA mycotoxins on the fermentation activity of brewing yeast, *EJPAU*, **11**(1), #9.

Frece J., Markov K. (2016) Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: Food biology, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis.

Giovati L., Magliani W., Ciociola T., Santinoli C., Conti S., Polonelli L. (2015) AFM<sub>1</sub> in Milk: Physical, Biological and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins*. **7**, 4330-4349.

HAH (2013) Što su mikotoksini?. HAH - Hrvatska agencija za hranu, <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>> Pristupljeno 30. svibnja 2017.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Peltonen, K.D., Salminen, S., Ahokas, J.T (1998) Sequestration of aflatoxin B<sub>1</sub> by probiotic strains: Binding capacity and localization. *Rev Med Vet.* **149**, str. 571.

Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J. (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact.* **128**, 39-49.

Haskard C.A., El-Nezami H.S., Kankaanpää P.E., Salminen S., Ahokas J.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **67**(7), 3086-3091.

Hassan Y.I., Zhou T., Bullerman L.B. (2015) Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Sci Technol Int.* **22**, 79-90.

Kuiper-Goodman, T. (1995) Mycotoxins: risk assessment and legislation, *Toxicol Lett.* **83**, 853–859. doi: 10.1016/0378-4274(95)03599-0.

Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Ahokas, J.T. (2004) Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit Contam.* **21**(2), 158-164.

Litopoulou-Tzanetaki, E. (1987) Interactions of *Pediococcus pentosaceus* and some food-borne pathogens, *Food Microbiology.* **4**(4), 293–302. doi: 10.1016/S0740-0020(87)80003-5.

Lowe, D. P., Arendt, E. K. (2004) The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing with Their Relationships to Antifungal Activity, Mycotoxins and Gushing: A Review, *J. Inst. Brew.* **110**(3), 163–180. doi: 10.1002/j.2050-0416.2004.tb00199.x.

Markov K., Frece J., Čvek D., Lovrić N., Delaš F. (2010) Aflatoksin M<sub>1</sub> u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo.* **60**, 244-251.

Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalak D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control.* **34**, 312-317.

- Mathur, C.F., Smith, R.C, Hawkins, G.E. (1976) Growth and morphology of *Streptococcus bovis* and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B<sub>1</sub>, in vitro. *J Dairy Sci.* **59**(3), 455–458.
- Muñoz R., Arena M.E., Silva J., González S.N. (2010) Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol.* **41**, 1019-1026.
- Nester, E. W., Anderson, D. G., Roberts., C. E., Pearsall, N. N., Nester, M. T. (2004) *Microbiology: A Human Perspective*, 4. izd., McGraw-Hill Professional, New York.
- Oancea, S., Stoia, M. (2008) A Review of Toxicology, Analytical Methods and Health Risks, *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, **12**, 19–31.
- Peltonen K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J., Salminen S. (2001) Aflatoxin B<sub>1</sub> binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J Dairy Sci.* **84**, 2152-2156.
- Pepeljnjak S., Cvetnić Z., Šegvić Klarić M. (2008) Okratoksin A i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva.* **50**, 147-159.
- Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2015) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje *Fusarium mycotoxins in food and feed.* **10**, 6–13.
- Pommerville, J. C., Alcamo, I. E. (2006) *Alcamo's Fundamentals of Microbiology*, 8. izd., Jones & Bartlett Publishers, Boston.
- Raju, M., V., Devegowda, G. (2000) Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *Br Poult Sci.* **41**(5), 640-50.
- Sambali, G., Mehrotra, R.S. (2009) *Principles of Microbiology*. Tata McGraw-Hill Education Pvt. Ltd., New Delhi. str. 55-56.

Sezer Ç., Güven A., Bılge Oral N., Vatansever L. (2013) Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by bacteriocins and bacteriogenic lactic acid bacteria. *Turk J Vet Anim Sci.* **37**, 594-601.

Steyn, P. S. (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol. Lett.* **82**, 843–851. doi: 10.1016/0378-4274(95)03525-7.

Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Šušković J., Kos B. (2001) Probiotici i prebiotici, interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Šutić M., Dević V., Obradović D., Banina A. (1983) Osetljivost sojeva *Lactobacillus casei* i *Lb. lactis* na aflatoksin B<sub>1</sub>. *Mljekarstvo.* **33**, 259-267.

Tankovic, J., Leclercq, R., Duval, J. (1993) Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**(4), 789–792. doi: 10.1128/AAC.37.4.789.

Todorov, S. D., Franco, B. D. G. D. M. (2012) *Lactobacillus Plantarum* : Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Rev Int.* **26**(3), 205–229. doi: 10.1080/87559129.2010.484113.

Turbic, A., Ahokas, J.T., Haskard, C.A. (2002) Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit Contam* , **19**, 144-152.

Varsha K.K., Napoothiri K.M. (2016) Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control.* **69**, 61-64.

Villani, F., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. (1997) Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *J Appl Microbio.* **82**(5), 578–588. doi: 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03588.x.

Wang, H.-Y., Wen, C-F., Chiu, Y-H., Lee, I-N., Kao, H-Y., Lee, I-C., Ho, W-H (2013) *Leuconostoc Mesenteroides* Growth in Food Products: Prediction and Sensitivity Analysis by Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference Systems. *PLoS One.* **8**(5). doi: 10.1371/journal.pone.0064995.

Westlake, K., Mackie, R.I., Dutton, M.F.(1987) T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth. *Appl Environ Microbiol.* **53**(3), 587–592.

Yitbarek, M. B., Tamir, B. (2013) Mycotoxines and / or Aflatoxines in Milk and Milk Products : Review. *ASRJETS.* 1–32.

Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Manes, J. (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin, *Food Chem Toxicol.* **45**(1), 1–18. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.030.